

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年3月31日現在

機関番号：14602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22820042

研究課題名（和文）文化財に含まれる膠およびコラーゲンのプロテオミクスによる解析法の開発

研究課題名（英文）Identification of Animal Species of Collagen Used as Glues in Archaeological Materials Utilizing MALDI Mass Spectrometry

研究代表者 河原 一樹 (KAWAHARA KAZUKI)

奈良女子大学・古代学学術研究センター・特任助教

研究者番号：60585058

研究成果の概要（和文）：動物中に最も豊富に存在するタンパク質であるコラーゲンは、膠として幅広い文化財に利用されている。本研究では、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化タンデム飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析法を用いて文化財中の膠の解析法を開発した。

文献調査の結果、膠の原料として用いられた可能性のある動物は、牛、鹿、魚、驢馬、そして兎など多岐に渡ることが判明したため、先ず、それらの膠を収集し、MALDI-TOF 質量分析を行う必要があった。その結果、各動物のコラーゲンのアミノ酸配列は非常に似ているものの、動物種に応じて若干の違いが見られることが判明した。このわずかな配列の差を利用して、およそ270年前および1300年前に奈良県で製造された墨に含まれる膠の原料動物種が牛に由来すると推定した。

研究成果の概要（英文）：Collagen, the most abundant protein in animals, has often been found as animal glue in a wide variety of archaeological materials. In this research project, we propose a methodology for unambiguously identifying animal glues in archeological materials, based on the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

According to ancient records, the animal glue can be prepared from a variety of animals such as cow, deer, fish, donkey, and rabbit. Despite very few substitutions of amino acids found in peptide peaks in the MALDI spectra of tryptic digest of such animal glues, we could distinguish among different animals including cow, deer, fish, and rabbit. Employing these peaks as markers, we identified type I collagen possibly from cow for the glue of ink sticks manufactured about 270 and 1300 years ago in Nara, Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,210,000	363,000	1,573,000
2011年度	1,110,000	333,000	1,443,000
総計	2,320,000	696,000	3,016,000

研究分野：歴史学

科研費の分科・細目：史学・考古学

キーワード：考古学、膠、コラーゲン、プロテオミクス、質量分析

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは動物中に存在するタンパク質全体の重量の約 30%を占めており、生命活動に必須の役割をするだけでなく、それを加工することで得られる膠は、古代エジプトから人類最古の接着剤として現在に至るまで使われ続けている稀有な素材である。それ故に、幅広い年代に渡る文化財試料中に含まれる膠コラーゲンの性質や、原料となる動物種、そして製法を知ることは、人類の生産技術・工芸史とその交流史を探る手がかりが得られる可能性を秘めている。

墨は膠の高度な加工品であり、製墨の技法は日本のみならず古代中国との技術・文化交流を反映する。興味深いことに、膠の原料に関する中国でおそらく最古の文献は、『列女伝』(前漢)を除けば6世紀北魏の『齊民要術』で、雌牛、水牛、豚、ロバ、馬、ラクダ、ラバなど様々な生物種におよんでいる。11世紀宋の『墨譜法式』にはさらに鹿、鯨(ニベ)が記載されており、日本の『延喜式』(平安時代)によると墨の製造用の膠は「阿膠」で、『和名抄』には牛の皮から取ると記載されている。しかしながら、これらの記述を裏付ける証拠はなく記述の真偽の確証はなかった。

一般的に、経年劣化や環境要因による分解が予想されるため、これまでに文化財に含まれるタンパク質が研究された例は少ない。しかしながら、八千万年前の恐竜の骨から抽出したコラーゲンの質量分析をもとに恐竜の進化上の位置を推定した研究や、5300年間のあいだ氷河に閉じ込められていた新石器時代人が身に付けていた毛皮に含まれるケラチンの分析例などが近年報告されており、コラーゲンを含めた幾つかのタンパク質に関してその分析可能性が示唆され始めている(Schweitzer, M. H. et al. (2009) *Science* **324**, 626; Hollemeyer, C. et al. (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2751)。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質コラーゲンのプロテオミクスによる分析法を確立し、文化財に含まれる膠に適用することで、文化財の原料や産地、製造法などの歴史情報を解読し、歴史研究および文化財修復の為に新しい学際的研究法を確立することを目的とする。

特に、古代から筆記用具として用いられてきた墨に焦点を絞り、その主要成分である煤の固着剤として約 40%含まれる膠の原料となったコラーゲンのアミノ酸配列を、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)質量分析法により解析し、原料動物種の同定を行う。墨に含まれる膠の原料となった動物種を明らかにすれば、日本の文化史、そして技術史を解明するための新たな情報を提示できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 実験試料

本研究では、文化財試料として、①約 270年前の 1742年に清国徽州の印工が作った墨型を用いて成形し、古梅園によって製造された墨および②約 1300年前の 710年~810年頃に製造され、平城京左京二条二坊の南を走る二条大路の南路肩に掘られた濠状遺構から出土した墨の2点を分析試料とした。

これらの試料に含まれる膠の動物種の同定のため、比較試料としてウシ、シカ、サカナ(ニベ)、ウサギの膠を各々用意し、標準試料として用いた。ウシとシカに関しては皮を原料とし、ニベに関しては浮き袋から抽出したコラーゲンを原料として製造された膠を利用した。ウサギ由来の膠に関しては、皮から抽出したコラーゲンを原料とした製品を利用した。

(2) 質量分析

各試料は、各々約 1 mg を測り採り、乳鉢中で 100 mM 炭酸水素アンモニウム(NH₄HCO₃)緩衝

液 1 mL とともに粉碎し、溶解した。この溶液を 100 mM NH_4HCO_3 緩衝液で洗ったシリンジフィルター (Whatmann/GDX-PTEE, 0.2mm 径) で濾過し、濾液を 1 時間 60°C で静置することで、含まれるコラーゲンの構造を変性させた。この液を室温に冷却後、10 μL のトリプシン溶液 (10 mg/mL 100 mM NH_4HCO_3) を加えて、37°C で 16 ~ 24 時間、酵素消化した。酵素消化によって生じるペプチド断片の混合物の溶液 10 μL に 40 μL の 0.5% トリフルオロ酢酸水溶液を加えて酸性 (pH 4.0) にし、ZipTip-C₁₈ で濃縮・脱塩して質量分析用の試料溶液とした。

MALDI サンプルプレート上で 1 μL の溶液 D と 1 μL のマトリックス溶液 (α -シアノ-p-ヒドロキシ桂皮酸のアセトニトリル溶液) を混ぜた後、乾燥させ、MALDI タンデム飛行時間型 (MALDI-TOF/TOF) 質量分析測定を行った。質量分析計は、AXIMA-Performance (Shimadzu/Kratos) を使用し、MALDI-TOF スペクトル及びヘリウムガスによる衝突誘起解離 (CID) に基づく MALDI-TOF/TOF スペクトルを測定した。MALDI-TOF スペクトル中に検出された各ペプチドのアミノ酸配列は、MALDI-TOF/TOF スペクトルの測定によって得られた開裂パターンを手動で解釈することによって推定した。また、最終的な動物種の同定は、質量分析データの解析結果から得られたアミノ酸配列をデータベースに登録されてある各種動物のコラーゲンのアミノ酸配列と照合することに加えて独自に用意した各動物種の膠試料の質量分析結果と直接比較することによって行った。

4. 研究成果

(1) 標準膠試料の MALDI-TOF 質量分析

文献情報から膠の原料となった動物種は多岐に渡ることが明らかとなっているが、現時点 (2012年3月) において、既存のアミノ酸配列データベースに登録されている I 型コラーゲンの種類

は極めて限られており、シカ、サカナ (ニベ)、スイギュウ、ラクダ、ラバは存在せず、ウマ、ブタ、ウサギに関しても部分的な配列が登録されているのみである。したがって、最終的な動物種の同定は、当該動物種から製造した膠の質量分析結果と文化財試料から抽出した膠の質量分析結果を直接比較対照することが必要であった。

本研究では、上記の候補動物の中から比較的入手の容易である、ウシ、シカ、サカナ (ニベ)、ウサギの膠を収集し、分析を実施した。

各動物種より調製した膠のトリプシン消化物の MALDI-TOF 質量分析の結果、得られた質量スペクトル中の信号の分布パターンは動物種に関わらず非常に似たものであることが明らかとなった。これはコラーゲンが動物の生命活動に必須のタンパク質であり、動物種に関わらず高度に保存されているためである。しかしながら、各 MALDI-TOF/TOF 質量スペクトルの詳細な比較解析の結果、幾つかの信号において動物種により数残基のアミノ酸の置換による質量/電荷比の差が生じることを検出することが出来た (図1)。

例えば、 m/z 1460 の信号が観測されるのは、ウシとシカのみであり、ウサギの場合は、 m/z 1454 に信号が検出され、サカナ (ニベ) では、 m/z 1487 に信号が検出される。ウサギとサカナ (ニベ) に関しては、 m/z 2130 付近の信号の分布パターンによっても見分けることが可能である。これらに加えて、 m/z 2840~2890 の拡大図が示すように、ウシは、 m/z 2853 に信号が観測されるものの、シカでは m/z 2883 に信号が観測される。興味深いことに、MALDI-TOF/TOF 質量スペクトルによるアミノ酸配列解析の結果、ウシの m/z 2853 に観測された信号は、GLTGPIGPPGP(O)AGAP(O)GPKGEAGPSGPAGPTGAR の配列を持つペプチドに由来し、シカの m/z 2853 に検出された信号は、GLTGPIGPPGP(O)AGAP(O)GPKGETGPSGPAGPTGAR の配列を持つ

ペプチドに由来することが明らかとなった。すなわち、配列中の下線部において、A(アラニン)からT(トレオニン)への変異によるものであることを見出した。

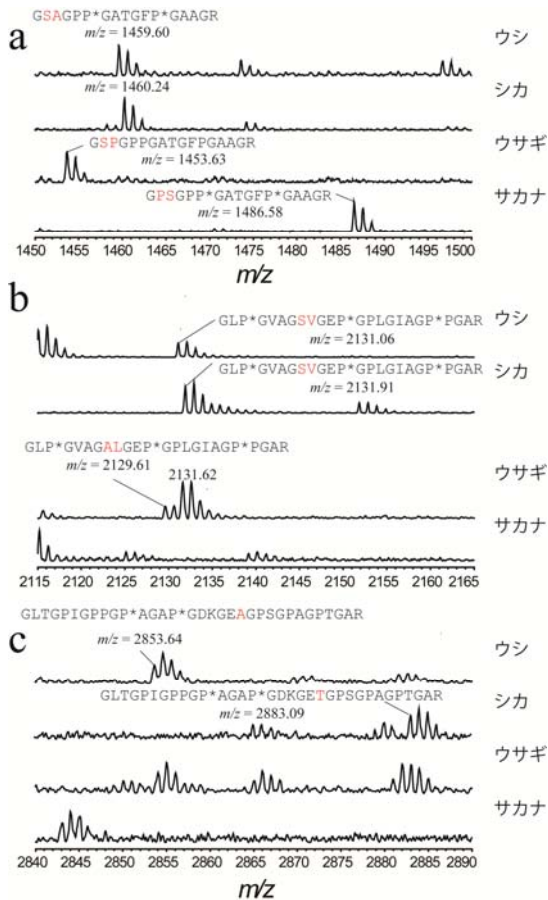


図1. 各動物由来膠試料のMALDI-TOF質量スペクトル

このような動物種による若干のアミノ酸配列の差を利用することによって、文化財試料中の膠の原料となった動物種を同定することが可能である。

(2) 江戸時代の墨のMALDI-TOF質量分析

本研究では、文化財の分析例として、製造年代が異なる二種類の墨を対象とした。1742年(江戸時代)に製造された墨から抽出された膠のトリプシン消化物のMALDI-TOF質量スペクトルは、良く分散した信号パターンを示しており(図2a)、スペクトル中で検出された主要な15本の信号については、MALDI-TOF/TOF質量分析で

得られる開裂パターンを解釈することにより、検出されたペプチド断片のアミノ酸配列を推定することができた(図2b)。

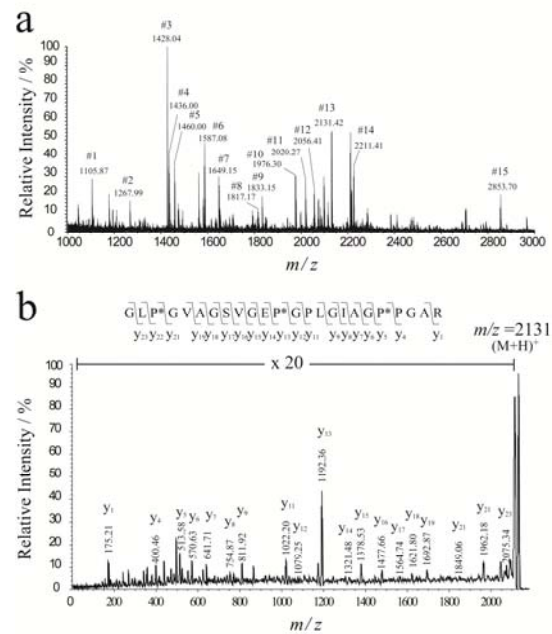


図2. 江戸時代の墨のMALDI-TOF質量スペクトル(a)とm/z 2131の信号のMALDI-TOF/TOF質量スペクトル(b)

MALDI-TOF/TOF質量分析を実施した15本の信号中には、先に述べた動物種を見分けるマーカーであるm/z 1460、2132、2853の信号が含まれており、各々の信号に由来するペプチドのアミノ酸配列もウシを原料とした膠に含まれる相当する信号の配列解析結果と完全に一致した。標準膠試料を利用した動物種の同定法および1742年(江戸時代)に製造された墨の分析結果の一部は、平成23年6月にアメリカで開催された59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Applied Topicsにおいて発表したほか、日本ペプチド学会発行の第81巻のPEPTIDE NEWSLETTERに論文が掲載された。

(3) 平城京出土墨のMALDI-TOF質量分析

平城京左京二条二坊の二条大路の南路肩に掘られた濠状遺構から出土した墨のMALDI-TOF質量スペクトルは、土壌環境を反

映して、不純物に由来する多数の信号が観測され、スペクトルが非常に複雑であった(図3)。

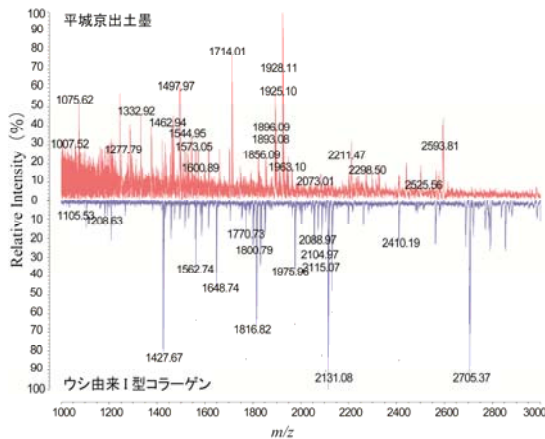


図3. 平城京出土墨のMALDI-TOF質量スペクトル

しかしながら、標準膠との詳細な比較により、ウシ由来コラーゲンの信号と一致する信号が観測され(図4)、出土墨中の膠の存在を強く示唆した。この結果は、およそ千年以上経過した墨試料中においても膠が分析可能な状態で存在することを示すものであり、牛の皮を原料とする日本の『和名抄』の記述と一致する結果である。

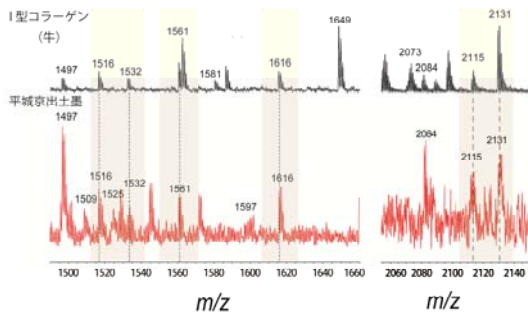


図4. 平城京出土墨のMALDI-TOF質量スペクトルの拡大図

しかしながら、多数の不純物による信号が観測されるべき膠に由来する信号と重なっているため、より詳細な解析は困難であった。遺跡や遺構から出土する墨製品の大多数は、この様な不純物を含んでいることが予想されたため、その解決策として、今後、電気泳動法、もしくはは

ナノ液体クロマトグラフィー(ナノLC)技術を利用した不純物の分離と質量分析を併用することを計画している。

平城京出土墨のMALDI-TOF質量分析結果に関しては、平成24年6月に開催される第29回日本文化財科学会で口頭発表を実施することが決定している他、海外学術雑誌への投稿を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

① Kawahara, K., Nemoto, N., (ほか9名、1番目), Polymorphism of Collagen Triple Helix Revealed by ^{19}F NMR of Model Peptide [Pro-4(R)-Hydroxyprolyl-Gly](3)-[Pro-4(R)-Fluoroprolyl-Gly]-[Pro-4(R)-Hydroxyprolyl-Gly](3), *J. Phys. Chem. B*, (2012年), 印刷中, 査読有

DOI:10.1021/jp212631q

② Park, H. S., Kawahara, K., (ほか6名、4番目), Conformational preferences of 4-chloroproline residues, *Biopolymers*, (2012年), 印刷中, 査読有

DOI:10.1002/bip.22054

③ Motooka, D., Kawahara, K., (ほか10名、2番目), The Triple Helical Structure and Stability of Collagen Model Peptide with 4(S)-Hydroxyprolyl-Pro-Gly Units, *Biopolymers*, (2012年), 98, 111-121, 査読有

DOI:10.1002/bip.21730

④ 中沢隆、河原一樹(ほか1名、2番目)「日本の古墳からの出土品に含まれる絹試料の質量

分析－質量分析による絹の特定とその古代的考察』『古代学』(2012年)4号、pp. 52-59、査読有

⑤河原一樹「膠コラーゲンの文化財・歴史科学への応用」『PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN』、(2011年)、第81巻、pp 1-4、査読無
<http://www.peptide-soc.jp/top.html>

⑥Kawahara, K., Yamazaki, Y. (ほか9名、1番目) Identification of Animal Species by the MALDI-MS of Collagen in Animal Glues of Chinese ink sticks, *Proceedings of the 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, (2011年), THP29. 査読無

[学会発表](計6件)

①Kawahara, K., Motooka, D., (ほか6名、1番目), Identification of Silk Proteins in Archaeological Materials, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 京都国際会議場, 日本

②Kawahara, K., Muguruma, M., (ほか7名、1番目), Identification of Animal Species of Collagen in Animal Glues Using MALDI Mass Spectrometry, The 2nd Asian Oceanic Mass Spectrometry Conference (AOMSC), 2011年8月19日, BEXCO, Busan, Korea

③宮路淳子、河原一樹 (ほか4名、2番目)質量分析による牽牛子塚古墳出土夾紵棺断片中の絹の確認、日本文化財科学会第28回大会、2011年6月11日、筑波大学、日本

④Kawahara, K., Yamazaki, Y., (ほか6名、1番目), Identification of Animal Species by the MALDI-MS of Collagen in Animal Glues of Chinese ink sticks, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2011年6月9日, Colorado Convention Center, Denver,

USA

⑤Kawahara, K., Yamazaki, Y., (ほか6名、1番目), Identification of Animal Species of Collagen Contained in Chinese Ink Stick Using MALDI Mass Spectrometry, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月9日, 神戸ポートアイランド, 日本
⑥宮路淳子、河原一樹 (ほか6名、8番目)、膠のコラーゲンのMALDI質量分析による動物種の同定、日本文化財科学会第27回大会、2010年6月26日、関西大学、日本

[その他]

ホームページ等

<http://www.nara-wu.ac.jp/proteome/aprp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河原 一樹(KAWAHARA KAZUKI)

奈良女子大学・古代学学術研究センター・特任助教

研究者番号:60585058